

Aislamiento e Identificación del Virus del Sarampión en cultivo de Células

Manual revisado 29 de noviembre de 2001

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas
División de Enfermedades Víricas y Rickettsiales
Sección de Virus Respiratorios y Entéricos
Unidad de Virus del Sarampión

Organización Panamericana de la Salud

Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud
División de Vacunas e Inmunización

Índice

- I. Introducción
- II. Materiales necesarios
- III. Cultivo celular
- IV. Procesamiento de los especímenes
- V. Inoculación de los especímenes para el aislamiento del virus del sarampión
- VI. Inmunofluorescencia
- VII. Obtención y transporte de especímenes clínicos
- VIII. Lista de referencias

I. INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de una línea celular sensible (B95a) para el aislamiento del virus del sarampión a partir de especímenes clínicos y el establecimiento de técnicas automatizadas para determinar la secuencia del ADN han permitido la caracterización genética rápida de un gran número de cepas de tipo salvaje del virus del sarampión. Esta base de datos de la información sobre la secuencia permite ahora usar técnicas epidemiológicas moleculares para identificar la fuente de los virus de tipo salvaje y para diferenciar entre las cepas de tipo salvaje y las vacunales (1-4).

A medida que se avanza hacia la eliminación del sarampión en muchas partes del mundo, será crítico examinar aislados víricos de tantos brotes y casos aislados como sea posible, a fin de identificar la procedencia del virus. En mayo de 1998, la OMS celebró una reunión para estandarizar los protocolos para la caracterización genética de los virus del sarampión de tipo salvaje y establecer un sistema uniforme para describir los genotipos (4). La obtención de especímenes de sarampión ayudará a determinar qué brotes epidémicos pueden estar relacionados y para vigilar los tipos de transmisión vírica. La capacidad de determinar la eficacia de los programas de eliminación del sarampión también se mejorará mediante la caracterización continua de los brotes esporádicos del sarampión (1).

El aislamiento y la caracterización genética del virus puede tardar varias semanas. Por consiguiente, **el diagnóstico de laboratorio del sarampión siempre debe basarse en la detección de IgM específica de sarampión en el suero.** Las pruebas de enzoinmunoanálisis (EIA) de IgM pueden hacerse en un día y se consiguen de varias empresas comerciales. Los especímenes (nasales, faríngeos y de orina) para el aislamiento del virus deben tomarse al mismo tiempo que se obtiene el suero, ya que un retraso en la recogida disminuirá la oportunidad de aislar el virus. Sin embargo, los especímenes nasales o de orina no

deben sustituir a los especímenes séricos para el diagnóstico del sarampión.

Un virus de Epstein-Barr transformado, la línea celular linfoblastoide B de tití (B95a), es la línea celular preferida para el aislamiento primario del virus del sarampión (5). Estas células son hasta 10.000 veces más sensibles para el aislamiento del virus del sarampión a partir de especímenes clínicos que otras líneas celulares comúnmente usadas, como Vero y PMK. Las células B95a son relativamente fáciles de mantener en el laboratorio y el efecto citopático (ECP) de la infección por el virus del sarampión se observa fácilmente. Sin embargo, los laboratoristas deben tener en cuenta que esta línea celular produce virus de Epstein-Barr y debe manejarse como material infeccioso en todo momento.

Las células B95-8 se obtienen de la American Type Culture Collection (# CRL 1612). Cuando se cultivan en el medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (SBF), estas células se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo y las células adherentes se denominan B95a. El crecimiento de las células se mantiene en un medio que contiene entre 8 y 10% de SBF. El SBF se usa a una concentración de 2% para el mantenimiento de células durante el aislamiento del virus. Es posible conseguir condiciones óptimas de crecimiento de las células en una incubadora húmeda de CO₂ (5%) a 37 °C (Véase la nota en la sección II). Los cultivos patrón de estas células se pueden preparar usando el medio ordinario de crioprotección (sección III).

II. MATERIALES NECESARIOS

1. Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM):
con 4.500 mg/L de D-glucosa (glucosa elevada)
con L-glutamina
sin piruvato de sodio
2. Antibióticos (100X)
penicilina G, 10.000 UI/ml
sulfato de estreptomina , 10.000 ug/ml en solución salina al 0,85%
3. Tripsina-EDTA
tripsina al 0,05% (de páncreas porcino)
0,53 mM de EDTA en HBSS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺
4. Suero bovino fetal (SBF)
5. Frascos de cultivo de 25 cm² (T-25) que contengan células B95a
6. Microscopio invertido, preferiblemente con contrastes ópticos de fase
7. Incubadora de cultivo de células

Nota: Se puede substituir el Medio MEM esencial mínimo cuando se dispone de la incubadora de CO₂. Se ha usado DMEM con buenos resultados con la adición del hepes buffer del 1% y NaCO₃ del 1%.

* El uso de nombres y proveedores comerciales en el presente manual no implica que estos sean avalados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

III. CULTIVO CELULAR

Pase de la línea celular B95a

1. Realice todos los procedimientos bajo un gabinete apropiado de bioseguridad. La línea celular B95a contiene virus de Epstein-Barr potencialmente infeccioso. Todo medio descartado debe colocarse en un bocal que contenga solución de hipoclorito al 10%.

2. Permita que el DMEM y la solución de tripsina adquieran la temperatura ambiente. Puede ser conveniente preparar cantidades pequeñas de DMEM mezclado con SBF.
3. Extraiga medio del frasco T-25 y lave las células con 3-5 ml de DMEM o con solución de tripsina agitando suavemente el frasco por unos 10-20 segundos; posteriormente, elimine la solución de lavado.
4. Agregue 1-2 ml de tripsina a las células del frasco T-25. Con la tapa firmemente en su lugar, agite suavemente el frasco. Las células se separarán rápidamente de la superficie del recipiente en unos 30-60 segundos. Desprenda las células golpeando el frasco con una mano. Las células deben soltarse fácilmente.
5. Agregue de inmediato 5 ml de DMEM al frasco (volumen total \approx 6 ml) para recoger las células y transferirlas a un tubo pequeño para mezcla.
Las células de un frasco pueden separarse a razón de 1:2, 1:3 ó 1:4. No haga el pase de las células de B95a a razones de separación mayores que 1:4. Después de las separaciones de 1:2 y 1:3, las células generalmente están preparadas para infectarlas en el plazo de 2 días.
6. Prepare el número deseado de frascos, agregando el volumen apropiado de suspensión de células a los frascos que contienen DMEM con 10% de SBF.

Ejemplo: Para establecer tres frascos T-25 a partir de un frasco T-25, agregar 5 ml de DMEM a las células tripsinizadas (volumen total \approx 6 ml). Agite suavemente hasta que se forme un vórtice o pipetee de arriba abajo. Distribuya 2 ml (separación 1:3) a cada T-25 con 10 ml de DMEM con 10% de SBF. Las células deben estar listas para infectarlas (75-85% de confluencia) en 2 o 3 días.

Preparación de cultivos patrón de células B95a (congeladas)

Es sumamente importante preparar muchos cultivos patrón de células B95a congelados, tan pronto como se cuente con ellas en el laboratorio. Estas células gradualmente perderán su capacidad de formar monocapas suaves y uniformes, lo cual dificulta más la detección del virus del sarampión. Se recomienda que las células B95a no se sometan a más de 30-35 pases.

Las células se pueden congelar usando cualquier técnica ordinaria de criopreservación. Hay medios de congelación comerciales, pero los reactivos descritos más adelante deben ser adecuados.

Prepare una solución del 90% SBF y 10% DMSO (o glicerol) y almacénelo en hielo. Asegúrese de permitir 1 ml por cada vial de células. Se puede preparar 10 viales de células para un frasco de 150 cm². Decante el medio de un frasco confluyente de 150-cm² de células B95a y guarde 10-20 ml del medio en un tubo centrífugo. Se deben retirar las células del frasco usando una pequeña cantidad de tripsina-EDTA. Agregue las células al medio decantado en el tubo centrífugo y centrifugue la suspensión de células a 400 x g durante 5 minutos. Deseche el medio y agregue 10 ml del volumen requerido de la solución criopreservación. Pipetee suavemente arriba y abajo a fin de mezclar y dispersar 1 ml en cada uno de 10 crioviales de plástico. Si se encuentran disponibles, se debe enfriar los viales usando usando un congelador programado de células o un producto comercial cocebido para la reducción gradual de la temperatura. Almacene los crioviales en nitrógeno líquido, pero sin sumergirlos

Transporte de las células B95a

Las células B95a pueden transportarse a temperatura ambiente en un frasco de cultivo tisular de 25 cm². Para el transporte, los frascos deben llenarse por completo con un medio que contenga DMEM y 2% de SBF, cerrándolos perfectamente. El paquete debe incluir un embalaje secundario a prueba de escape de líquidos requerido para materiales infecciosos sensibles al calor y estar identificado con las etiquetas apropiadas. En la sección VII se da información adicional sobre el envío.

Después del envío, mire la capa de células. Si muchas células flotan libremente, la centrifugación (1500 rpm, 5 min) del medio recuperará células que pueden devolverse al frasco (o agregarse a otro frasco para el pase). Para un frasco de 25 cm², agregue 10-15 ml del medio para el mantenimiento.

IV. PROCESAMIENTO DE LOS ESPECÍMENES

A medida que se van recibiendo los especímenes, hay que asignarles un número de identidad del laboratorio, y la información relativa al paciente y al espécimen debe anotarse en el libro de registro o en una hoja de cálculo electrónica. La información del espécimen puede ser útil para identificar problemas que pueden contribuir a la pérdida de virus y a la incapacidad para hacer los aislamientos. Es necesario reportar los problemas con el envío o con las muestras a la persona que hizo el envío de los especímenes.

Datos importantes que se deben registrar:

Información del paciente

Edad

Fecha de nacimiento

Fecha de aparición del exantema

Fecha de la extracción de sangre

Resultado de IgM

Fecha de vacunación antisarampionosa

Información del espécimen

Tipo (orina, exudado faríngeo, lavado nasal, sangre)

Fecha de obtención de la muestra

Volumen (orina)

Condición (temp. al llegar)

Medidas tomadas (centrifugación, lugar de almacenamiento)

Hisopados o aspirados faríngeos, nasales o nasofaríngeos: Si el espécimen llega como material congelado en 2-3 ml de medio celular o PBS, se puede congelar tal como está o se puede almacenar a 4 C. Si se envía el tubo original del hisopado, agregue 2 ml de DMEM y agite circularmente hasta que se forme un vórtice para recoger el material del hisopado y exprima cuanto sea posible el hisopo apretándolo contra la pared del tubo. Si el detrito es pesado, centrifugue para extraerlo.

Orina: Si se encuentra disponible una centrífuga, transfiera la orina al tubo(s) a fin de recoger el sedimento por 5 – 10 minutos a 400 x g. (Se recomienda una centrífuga refrigerada, pero en caso contrario comience con la orina que se ha enfriado a 4 C. Resuspenda el sedimento en 2 ml de DMEM frío. Si no se encuentra disponible una centrífuga, transfiera la orina a recipientes estériles a prueba de escapes y manténgalos fríos.

Sangre heparinizada: Use un producto concebido para separar los linfocitos de la sangre periférica durante la centrifugación.

Importante: Se recomienda dividir la muestra en caso de que la contaminación sea un problema. No filtre sistemáticamente los especímenes clínicos antes de la inoculación. No obstante, si se encuentra que un cultivo está contaminado en el primer intento de aislamiento, el otro espécimen puede filtrarse. (Para filtrar el espécimen, completar el volumen a 1-2 ml con DMEM, luego filtrar el contenido por un filtro de jeringa [0,45 µm] y recoger en un tubo).

V. INOCULACIÓN DE LOS ESPECÍMENES PARA EL AISLAMIENTO DEL VIRUS DEL SARAMPIÓN

1. Las células deben presentar una confluencia de 75-85% cuando los especímenes se inoculan.
2. Para la infección inicial de las células B95a (frasco T-25), decante el medio, agregue el espécimen (en

un volumen total de 1,5 ml, suficiente para evitar que la monocapa se seque). Los especímenes clínicos generalmente consisten en sedimento urinario o especímenes faringeo-nasales centrifugados que se han resuspendido en un volumen pequeño (1,0-2,0 ml) del medio de cultivo de tejidos. El procesamiento de los especímenes clínicos se describe en la sección anterior (sección 4).

3. Incube a 37 °C durante 1 hora para permitir que el virus se adsorba. Después del período de absorción, observe las células con el microscopio para evaluar si la muestra fue tóxica para las células (redondeo de las células, células flotantes). A menudo, las células se recuperarán pero pueden necesitar un cambio de medio. Esto es el pase #1 del virus.
4. Agregue 10 ml de DMEM que contenga 2% de SBF, con antibióticos agregados.

Tratamiento de los especímenes con antibióticos: En el momento de la inoculación, puede agregarse a los medios penicilina o estreptomina. Cuando la penicilina se presenta como 10.000 UI/ml y la estreptomina como 10.000 ug/ml, agregar a razón de 1:50-1:100 para que la concentración final en el medio sea de 100-200 de UI/ml penicilina y 100-200 ug/ml de estreptomina.

5. Al día siguiente, revise las células. A menudo, un día después de la inoculación pueden verse orificios diminutos en la monocapa del frasco cuando éste se sostiene contra una fuente de iluminación. Si se observan orificios en la monocapa, examinar por microscopio para buscar células fusionadas (sincitio). A veces los focos infectados se desprenden de la monocapa y flotan en el medio. Tenga presente que en la monocapa pueden aparecer algunos orificios que no son causados por el virus del sarampión. Mire si se presentan indicaciones de contaminación. Si hay bacterias o levadura presentes, deseche el frasco.
6. Cambie el medio de las células si parece demasiado ácido (anaranjado-amarillo). Centrifugue para recoger las células si usted sospecha que los orificios en la monocapa son causados por el virus del sarampión, y regréselas al frasco.
7. Efectúe el pase de las células cuando la monocapa sea confluyente, generalmente 2 días después de la inoculación. Transfiera medio a un tubo, junto con células tripsinizadas y centrifugue (400 x g por 5 –10 minutos). Resuspenda las células en una cantidad pequeña de medio (≈6 ml) y mezcle o agite circularmente hasta que se forme un vórtice. Después de la infección inicial, se recomienda usar todas las células, distribuyendo cada mitad en un frasco T-25 (pase # 2 del virus). Agregar DMEM con 2% de SBF.
8. Revise los frascos diariamente. Puede ser necesario separar las células nuevamente en 1-2 días. Para el pase #3, usar una separación de 1:2 y descartar las células restantes. Si no se observa el ECP después del pase #3, descartar.
9. Cuando el ECP sea visible, siga alimentando las células (cambie el medio, si es necesario) hasta que dicho efecto sea extenso. Puede ser necesario redistribuir las células o someterlas a otro pase 1-2 veces para permitir que la infección se propague antes de que las células se multipliquen excesivamente. Cuando el ECP es visible en al menos 50-75% de la capa de células, el virus ha alcanzado un título apropiado para preparar un patrón vírico.
10. Para preparar una patrón vírico, raspe las células en el medio con un raspador celular. Mezcle y distribuya en 4-6 tubos y almacénelos a –70 C.

Si se observa el ECP típico del sarampión, la confirmación del virus del sarampión puede no ser necesaria

si los síntomas clínicos han sido consistentes para un caso de sarampión.

VI. INMUNOFLUORESCENCIA

Esta prueba de inmunofluorescencia (IFA) usa un anticuerpo monoclonal para detectar la nucleoproteína del virus del sarampión en las células infectadas. Las células infectadas se fijan en un portaobjetos. El enlace del anticuerpo específico contra el sarampión se detecta usando un anticuerpo caprino antirratón que se conjuga con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La unión del anticuerpo detector se visualiza mediante microscopía de fluorescencia.

Los estuches de IFA directa e indirecta se obtienen comercialmente de varios proveedores. En esta exposición se describirá la prueba de inmunofluorescencia indirecta del sarampión Light Diagnostics, de Chemicon, Inc. (catálogo #3187).

También es posible configurar una prueba de IFA indirecta sin usar un estuche comercial. La mayoría de los anticuerpos monoclonales contra la nucleoproteína funcionarán bien en el procedimiento de IFA descrito a continuación. En particular, el Mab:KK2 se obtiene del banco de reactivos de sarampión de la OMS, mantenido por el Dr. Fabian Wild en Lyon (Francia). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra otras proteínas víricas, como la hemaglutinina y las proteínas de fusión, pueden reconocer los epitopos conformacionales que no son estables después de la fijación con acetona.

Procedimiento Chemicon

1. Coloque 1 ml de células desprendidas (es decir, 1 /10 del volumen de células desprendidas de un frasco T-25) en un tubo pequeño de centrifuga y sométalo a centrifugación a 400 x g durante 10 min a 4 °C para separar la pella de sedimento. Decante el medio sobrenadante y resuspenda las células en 1,0 ml de solución salina con tampón de fosfato (PBS). Extienda unos 15 ul en una cámara del portaobjetos, utilizando para ello una micropipeta o pipeta de Pasteur, y deje que las células se sequen al aire. Acuértese de incluir células testigo no infectadas.
2. Una vez que las células estén completamente secas, coloque el portaobjetos en un recipiente de tinción que contenga acetona al 80% (en agua) muy fría, durante 10 minutos. Extraiga el portaobjetos y déjelo secarse al aire.
3. Prepare el tampón de PBS-Tween que viene con el estuche (PBS, 0,1% ,Tween 20).
4. Cubra las manchas de células en el portaobjetos con una gota del anticuerpo monoclonal contra el sarampión.
5. Incube el portaobjetos a 37 °C durante 30-60 minutos en una cámara húmeda. Las cajas de Petri que contienen una toalla de papel húmeda funcionan muy bien para este efecto.
6. Lave los portaobjetos durante 15-20 segundos en el tampón de PBS-Tween y sacúdalos para eliminar el exceso de tampón.
7. Agregue a la mancha de células una gota de conjugado de IgG antirratón con FITC.
8. Incube el portaobjetos a 37 °C durante 30 minutos en una cámara húmeda.

Lave los portaobjetos durante 15-20 segundos en el tampón de PBS-Tween y sacúdalos para eliminar el exceso de tampón. Prepare los portaobjetos para examinarlos con líquido de montar y un cubreobjetos.

Examínelo en busca de fluorescencia con un microscopio de fluorescencia. FITC absorbe a 495 nm con emisión máxima a 525 nm. En estas condiciones, las células con tinción positiva mostrarán una fluorescencia granulosa verde en el citoplasma. La coloración de contraste con azul de Evans se verá roja (figura 2).

VII. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE ESPECÍMENES CLÍNICOS

Los especímenes para el aislamiento del virus deben obtenerse cuanto antes cuando se sospecha de la infección del sarampión, preferiblemente al comienzo de la erupción cuando se recoge la muestra del suero.

Ambas muestras de orina y de las vías respiratorias son buenos especímenes clínicos para el aislamiento del virus. En los pacientes de muy corta edad, puede resultar más fácil obtener que la orina. Otros tipos de muestras respiratorias pueden ser más fáciles de obtener en una clínica y hospital donde se encuentra disponible el equipo y, por consiguiente, se recomienda aprovechar esa oportunidad. A continuación se describen los protocolos.

A. *Especímenes de las vías respiratorias*

Materiales:

1. Hisopos estériles
2. Solución salina estéril
3. Alícuotas de 3 ml de medio de transporte de virus (MTV: PBS estéril o solución isotónica apropiada como BSS de Hanks, etc., con antibióticos agregados [penicilina, 100 UI/ml; estreptomicina, 100 ug/ml] y 2% de suero bovino fetal o 0,5% de gelatina en tubos de centrifuga de policarbonato o de poliestireno de 15 ml)
4. Jeringas de plástico de 5 ml
5. Aspiradores o jeringas de plástico de 30 ml
6. Criotubos
7. Envases de poliestireno para embalaje

Instrucciones:

1. Procure obtener la muestra lo antes posible después de la aparición del exantema. Con mucha frecuencia se logra el aislamiento del virus dentro de los primeros 3 días después de la aparición del exantema (y es aceptable hasta 7 días después de la aparición del exantema).
2. El espécimen de las vías respiratorias que se prefiere es un lavado nasal (aspirado nasofaríngeo) empleando una jeringa acoplada a un tubo de plástico. Después de introducir 3-5 ml de solución salina en la nariz, aspire el mayor volumen del material que sea posible y agréguelo al tubo de centrifuga que contiene el MTV. (En un consultorio u hospital, la aspiración por vacío puede aumentar la recuperación del líquido.) Enjuague la jeringa y el tubo, y agregue el líquido de lavado al MTV.
3. Alternativamente, pueden usarse hisopos estériles para limpiar la nariz y la garganta. Coloque los dos hisopos en un tubo que contenga 2-3 ml de MTV. El virus está muy vinculado con las células, de manera que es preciso frotar la garganta y las vías nasales para recoger células epiteliales. El hisopo se puede dejar en el tubo de MTV.
4. Mantenga todos los especímenes sobre hielo húmedo o a 4 °C y envíelos a un laboratorio apropiado cuanto antes en hielo húmedo (véase la dirección más adelante). Este es el método preferido para el transporte. Si esto no es posible, más adelante se describen algunas opciones.

Los siguientes procedimientos son adecuados si el transporte inmediato en frío (en un plazo de 48 horas) no puede organizarse o no es conveniente. Si hay una demora, y si es posible, congele las muestras a -40 a -70 C y envíelas congeladas con hielo seco.

B. Especímenes de orina

Materiales:

1. Recipientes para muestras de orina, preferentemente con tapa.
2. Tubos de centrifuga de poliestireno de 50 ml.
3. PBS o DMEM
4. Criotubos
5. Envases para embalaje

La orina debe recogerse en los 7 días siguientes a la aparición del exantema (¡Lo mejor es entre 1 y 3 días!). Los especímenes de la primera micción de la mañana son ideales, pero cualquier muestra de orina es adecuada. Recoja hasta 10-50 ml de orina en un envase para muestras de orina.

Es mejor centrifugar el espécimen de orina lo antes posible después de recogerlo. Después de obtenerlo, conserve el espécimen en frío (refrigerador o hielo húmedo). Para el procesamiento, transfiera 50 ml del espécimen a un tubo plástico de centrifuga de 50 ml y centrifugue a $400 \times g$ durante 5-10 minutos a 4 °C para formar una pella de sedimento. Resuspenda el sedimento en 2 ml de MTV (véase anteriormente) o cualquier medio de cultivo celular (DMEM, EMEM, RPMI más antibióticos) y despáchelo. De preferencia, los especímenes que se han centrifugado y resuspendido deben congelarse a -70 °C y transportarse en hielo seco. Si no hay hielo seco, sin embargo, pueden almacenarse a 4 °C y transportarse en hielo húmedo.

Si no se cuenta con centrifuga, no congele la muestra de orina. Todo el espécimen de orina debe almacenarse a 4 °C y enviarse al laboratorio en hielo húmedo. Es mejor entregar el espécimen en un plazo de 24 horas para que pueda procesarse y congelarse a -70 °C a fin de lograr la recuperación vírica óptima y de que haya menos oportunidades de contaminación. Cierre herméticamente el envase del espécimen para evitar escapes.

C. Muestras de sangre

El virus también puede aislarse a partir de los linfocitos. No obstante, si es posible recoger varios mililitros de sangre heparinizada, los linfocitos serán una buena fuente del virus. La sangre entera debe almacenarse a 4 °C y transportarse al laboratorio antes de transcurridas 24-48 horas de su extracción.

D. Despacho de especímenes clínicos y aislados víricos

Se recomienda usar recipientes hechos específicamente para el envío de sustancias infecciosas. Para el transporte de aislados víricos en cultivo de células, es mejor enviar un recipiente plástico de cultivo tisular de 25 cm^2 . Las células deben ser inoculadas 1-2 días antes del transporte. Antes de efectuar un envío, llene el frasco hasta el borde con DMEM (más antibióticos y 2% de SBF). Apriete firmemente la tapa y selle con película o cinta plástica. Es mejor colocar el recipiente en un envase hermético, como una bolsa plástica de cierre automático, y transportarlo a temperatura ambiente.

Las células infectadas pueden centrifugarse para reducir las a una pella, resuspenderse en un volumen pequeño de DMEM y congelarse a -70 °C antes de despacharlas en hielo seco.

E. Información sobre el transporte

Los CDC son el Banco de Cepas de Virus del Sarampión designado por la OMS y aceptan aislados víricos o especímenes clínicos de casos serológicamente confirmados de sarampión para su caracterización

genética. Los aislados víricos y los especímenes clínicos que llegan de fuera de Estados Unidos requerirán la licencia de importación de los CDC.

Es importante notificar a la Unidad de Virus del Sarampión antes del transporte. De esta manera, se indicarán los transportistas y métodos específicos de transporte para cada laboratorio.

Tel: 404-639-1156 -3512
Fax: 404-639-4187
E-mail: jrota@cdc.gov

Una copia de la licencia de importación debe acompañar a los documentos de transporte. Una copia de la etiqueta deberá pegarse al envase de embalaje exterior. Comuníquese (por teléfono, fax o correo electrónico) para obtener una licencia válida si ha caducado la fecha o si se ha perdido la licencia.

Despache los materiales a:

Dr. William J. Bellini
Measles Virus Section, C-22
DASH Group #81
Centers for Disease Control and Prevention
1600 Clifton Rd.
Atlanta, GA 30333 USA

Tel: 404-639-3512

VIII. REFERENCIAS

1. Rota J.S., Rota P.A., Redd S.B., Redd S.C., Pattamadilok S., y Bellini W.J. Genetic analysis of measles viruses isolated in the United States 1995-1996. *J Infect Dis* **1998**; 177:204-8.
2. Rota J.S., Heath J.L., Rota P.A., King G.E., Celma M.L., Carabaña J., Fernandez-Muñoz R., Brown D., Jin L., y Bellini W.J. Molecular epidemiology of measles virus: Identification of pathways of transmission and the implications for measles elimination. *J Infect Dis* **1996**; 173:32-7.
3. Rota P.A., Rota J.S. y Bellini W.J. 1995. Molecular epidemiology of measles virus. *Semin in Virol* **1995**; 6:379-86.
4. World Health Organization. Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses. *Weekly Epidemiological Record* **1998**; 73:265-72.
5. Kobune F, Sakata H, y Sugiura A. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol* **1990**; 4:700-5.